

No English title available.

Patent Number: DE19530412

Publication date: 1997-02-20

Inventor(s): MELCHNER HARALD VON PROF DR
MANUEL DR (DE)

Applicant(s): MELCHNER HARALD VON PROF DR (DE),
MANUEL DR (DE)

Requested Patent: DE19530412

Application

Number: DE19951030412 19950818

Priority Number(s): DE19951030412 19950818

IPC Classification: C12N15/79; C12N15/86; C12N5/10; A61K48/00

EC Classification: C12N15/86C

Equivalents: AU4941096, EP0845041 (WO9707223), JP11511018T, WO9707223

PETER DR (DE); GREZ

ER DR (DE); GREZ

Abstract

The invention involves the development of vectors for somatic gene therapy. The vectors transduce a complete transcriptional unit containing a promoter, a protein coding sequence and a polyadenylation sequence into the genome of mammalian cells. Upon integration, the vectors delete most viral and non-viral sequences unrelated to transcriptional unit thus avoiding common problems encountered with conventional retrovirus vectors such as repression of gene expression by transcriptional silencing, mobilization of endogenous retroviruses, activation of oncogenes or development of an immune response. The invention exploits (i) the natural life cycle of retroviruses, involving duplication of the terminal control regions U5 and U3 to generate long terminal repeats (LTR) and (ii) the ability of site specific recombinases to excise any sequences positioned between two specific target sequences from the mammalian genome. Thus, the retroviruses of the invention transduce the coding sequences of a site specific recombinase and at least one recombinase-specific target sequence into the genome along with the transcriptional unit expressing a therapy gene.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
DE 195 30 412 A 1

(51) Int. Cl. 6:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/86
C 12 N 5/10
A 61 K 48/00

(21) Aktenzeichen: 195 30 412.8
(22) Anmeldetag: 18. 8. 95
(43) Offenlegungstag: 20. 2. 97

DE 195 30 412 A 1**(71) Anmelder:**

Melchner, Harald von, Prof. Dr., 60596 Frankfurt, DE;
Grez, Manuel, Dr., 60596 Frankfurt, DE; Russ,
Andreas Peter, Dr., 60596 Frankfurt, DE

(74) Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(56) Entgegenhaltungen:

Cell, Vol. 73, S. 1155-1164, 18. Juni 1993;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Selbst deletierende retrovirale Vektoren für die Gentherapie

(57) Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Retroviren für die somatische Gentherapie zu konstruieren, die eine komplette Transkriptionseinheit in das Genom von eukaryonten Zellen so einführen, daß nach Integration sämtliche nicht unmittelbar zur Transkriptionseinheit gehörenden viralen und nicht-viralen Sequenzen eliminiert werden. Diese Aufgabe wird durch den Einbau einer für eine sequenzspezifische Rekombinase kodierende Sequenz und mindestens eine für die Rekombinase spezifische Targetsequenz in den Retrovirus gelöst. Dadurch werden die üblichen, mit retrovirlen Gentherapievektoren assoziierten assoziierte Probleme, wie Abschaltung der Genexpression, Aktivierung von Proto-onkogenen, Mobilisierung durch endogene Retroviren und Entwicklung einer Immunantwort vermieden.

DE 195 30 412 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 96 602 068/270

7/27

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Retroviren, die eine für eine sequenzspezifische Rekombinase kodierende DNA-Sequenz und mindestens eine für die Rekombinase spezifische Targetsequenz enthalten. Diese Retroviren können eine komplette Transkriptionseinheit in das Genom von eukaryonten Zellen so einführen, daß nach Integration sämtliche nicht unmittelbar zur Transkriptionseinheit gehörenden viralen und nicht-viralen Sequenzen eliminiert werden. Lediglich eine Transkriptionseinheit, bestehend aus natürlichen oder synthetischen Promotor/Enhancer Sequenzen, Protein kodierender Sequenz und Polyadenylierungssignal verbleibt im Genom. Damit werden gängige, mit konventionellen retrovirusalen Vektoren assoziierte Probleme, wie Abschaltung der Genexpression, Aktivierung von Protoonkogenen, Mobilisierung durch endogene Retroviren und Entwicklung einer Immunantwort vermieden.

Hintergrund der Erfindung

Retroviren sind RNA-Viren, die nach Eindringen in die Zelle zu doppelsträngiger DNA umgeschrieben werden. Das RNA Genom wird an beiden Enden von kurzen, repetitiven (R) und 5' bzw. 3' Ende spezifischen Kontrollsequenzen (U3 und U5) flankiert. Zwischen den Kontrollregionen befinden sich kodierende Sequenzen für virale Strukturproteine (gag und env) und Enzyme (pol Protease, reverse Transkriptase und Integrase).

Unmittelbar nach Infektion wird in der Targetzelle durch viruseigene reverse Transkriptase die virale RNA in DNA konvertiert. Die DNA Synthese wird durch die Bindung von zellulärer tRNA an komplementäre Sequenzen im Retrovirusgenom eingeleitet. Die Bindungsstelle befindet sich unmittelbar 3' von der U5 Region und heißt – primer binding site – (PBS) (Fig. 1). Durch die reverse Transkription werden die terminalen Sequenzen U3 und U5 dupliziert, und das retrovirale Genom zwischen zwei identische Kontrollregionen, den –long terminal repeats– (LTR), plaziert. Die LTR-flankierten DNA Moleküle integrieren als –Proviren– in das Genom. Provire werden zusammen mit der zellulären DNA repliziert und als zelluläre Gene transkribiert. Die Transkription initiiert in der mit Promotor/Enhancer Sequenzen versehenen U3-Region des 5' LTR und terminiert in der R-Region des 3' LTR. Genomische Transkripte werden aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert und dort entweder in Viruspartikel verpackt oder zu gag und pol Proteinen translatiert. Zusätzlich wird eine Fraktion der genomischen RNA zu env-mRNA gesplited.

Retroviren können zu Gentransfer-Vektoren adaptiert werden. Bis auf bestimmte LTR-Kontrollsequenzen, der PBS und spezifischer Verpackungssignale kann nahezu das gesamte retrovirale Genom deletiert werden, ohne daß es zu wesentlichen Einschränkungen der Replikation kommt. Voraussetzung dafür ist die Präsenz der für reverse Transkription, Integration und Partikelbildung notwendigen Proteine. Typische Zellen dieser Art sind die sog. Helferzellen, die ein komplettes retrovirales Genom exprimieren. In diesen Zellen werden die Transkripte rekombinanter Retrovirus-Vektoren präferentiell zu Viruspartikeln verpackt, weil anders als in den Vektoren, die spezifischen Verpackungssignale

–Ψ— aus dem Helfervirusgenom deletiert wurden.

Konventionelle retrovirale Vektoren werden in über 80% der genehmigten Gentherapie-Protokolle benutzt. Allerdings ist dies mit potentiellen Problemen und Gefahren verbunden, die sich wie folgt zusammenfassen lassen: (i) Abschaltung von Expression transduzierter Gene durch Methylierung oder Bindung von Repressormolekülen (1, 4, 7); (ii) zufällige Integration an verschiedenen Orten des Genoms und gelegentliches Stimulieren einer malignen Transformation durch aktivierende Insertion oberhalb von Protoonkogenen (12, 13); (iii) Mobilisierung der Vektoren durch Rekombination mit endogenen Retroviren (2, 5, 9) und (iv) Auslösung einer Immunantwort gegen virale und nicht-virale Antigene mit Elimination der transduzierten Zellen (11).

Zusammenfassung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Retroviren zu konstruieren, die eine komplette Transkriptionseinheit in das Genom von eukaryonten Zellen so einführen, daß nach Integration sämtliche nicht unmittelbar zur Transkriptionseinheit gehörenden viralen und nicht-viralen Sequenzen eliminiert werden. Diese Aufgabe wird durch die erfindungsgemäßen Vektoren gelöst, die eine für eine sequenzspezifische Rekombinase kodierende Sequenz und mindestens eine für die Rekombinase spezifische Targetsequenz enthalten. Diese können Cre Rekombinase und loxP oder Flp-Rekombinase und frt sein. Anders als bei konventionellen Retroviren, bleibt bei den Retroviren der Erfindung die typische provirale Architektur -LTR-Strukturgene-LTR nicht erhalten.

Die Retroviren enthalten vorzugsweise in der U3 oder U5 Region eine aus Promotor, Protein-kodierender Sequenz und Polyadenylierungssequenz zusammengesetzte Transkriptionseinheit. Ebenfalls vorzugsweise in der U3 oder U5 Region befinden sich die natürlichen oder synthetischen Targetsequenzen eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems. Derartige Targetsequenzen werden von einer sequenzspezifischen Rekombinase erkannt, gebunden und rekombiniert. Dadurch werden DNA Fragmente, die sich zwischen zwei gleichgerichteten Targetsequenzen befinden, zusammen mit einer der beiden Targetsequenzen deletiert (Fig. 2).

In den Retroviren der Erfindung befinden sich die Targetsequenzen bevorzugt in der U3 oder U5 Region und werden zusammen mit diesen während der Replikation dupliziert. Dadurch gelangt das retrovirale Genom zwischen zwei gleichgerichtete Targetsequenzen und wird in Gegenwart von Rekombinase deletiert. Im Genom verblebt hauptsächlich eine Kopie der transduzierten Transkriptionseinheit. Die Rekombinase kann entweder als Protein, oder als DNA in einem Expressionsplasmid den Zellen zusätzlich hinzugefügt werden, oder befindet sich vorzugsweise als Protein-kodierende Sequenz auf dem Provir selbst (Fig. 3, 4). Deren Position ist bevorzugt zwischen den beiden Targetsequenzen und außerhalb der Kontrollregionen. Die Expression der Rekombinase wird vorzugsweise von einem zweiten natürlichen oder synthetischen Promotor kontrolliert. Ein Polyadenylierungssignal wird vorzugsweise in der R Region des 3' LTRs gefunden. Bei umgekehrter transkriptioneller Orientierung in Relation zu dem Provir wird eine cryptische oder eine zusätzliche natürliche oder synthetische Polyadenylierungssequenz in umgekehrter Orientierung genutzt.

Die Viren der Erfindung sind vorzugsweise enhancer/

und oder promotorlos. Die Erfahrung betrifft demnach ebenfalls Retroviren die weiterhin einen viralen Promotor und/oder Enhancer umfassen.

Die Viren der Erfahrung sind vorzugsweise zur Transduktion von Therapiegenen in Säugerzellen gedacht, können aber auch zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen genutzt werden.

Die Viren der Erfahrung können potentiell auch schädliche Sequenzen enthalten, sofern diese nach Integration zeitgerecht deletiert werden. Eine potentielle Applikation ist demnach die Anpassung pathogener Viren (z. B. HIV, HTLV1) für die somatische Gentherapie, weil deren hohe Transduktionseffizienzen getrennt von deren Pathogenität genutzt werden können.

Weiterhin betrifft die Erfahrung Säugetierzellen, deren Genom mindestens eine mit den Viren der Erfahrung eingeführte sequenzspezifische Targetsequenz, die loxP oder frt sein kann, und mindestens eine Protein-kodierende Sequenz enthalten. Diese Zellen enthalten im wesentlichen kein provirales Genom.

Schließlich betrifft die Erfahrung ein Verfahren zur Transduktion von cDNA Sequenzen in das Genom von Säugerzellen, das im wesentlichen die Transfektion von Vepackungszelllinien mit den Retroviren der Erfahrung, die Selektion virusproduzierender Klone, die Infektion von Säugerzellen und die Expression der sequenzspezifischen Rekombinase mit assoziierter Deletion der Rekombinase-enthaltenden Transkriptionseinheit umfaßt.

Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

Der Begriff "Retrovirus" umfaßt jeden RNA Virus, der sich über DNA Zwischenmoleküle repliziert. Dazu gehören auch Viren, die nur zusammen mit anderen Viren, (z. B. Helferviren) replizieren, oder Retroviren mit Deletions und Mutationen.

Der Begriff "Kontrollregion" umfaßt die LTR Region bestehend aus U3, R und U5.

Der Begriff "Transkriptionseinheit" umfaßt einen natürlichen oder synthetischen Promotor, eine Protein-kodierende Sequenz und ein Polyadenylierungssignal.

Der Begriff "Promotor" kann, aber muß nicht einen Enhancer einschließen.

Der Begriff "Protein-kodierende Sequenz" bezieht sich auf eine DNA Sequenz, deren Polypeptidprodukt therapeutisch wirksam ist, oder den Metabolismus der Zelle auf irgendeine Weise beeinflußt. Der Begriff umfaßt ebenfalls Sequenzen, die allgemein als "Selektionsmarker" bekannt sind.

Der Begriff "Targetsequenz" bezieht sich auf natürliche oder synthetische Sequenzen, die von einer Rekombinase spezifisch erkannt werden. Beispiele hierfür sind die loxP Sequenzen aus dem P1 Coliphagen (8, 16, 17) und die frt Sequenzen aus *S. cerevisiae* (3, 6, 14).

Der Begriff "Rekombinase" umschreibt ein natürliches oder synthetisches Enzym, das spezifische Targetsequenzen erkennt, schneidet und miteinander rekombiniert. Beispiele hierfür sind die Cre-Rekombinase aus dem P1 Coliphagen (17) und die FLP Rekombinase aus *S. cerevisiae* (3).

Die vorliegende Erfahrung involviert deletierbare Retroviren, die vorzüglich als Vehikel für Gene im Rahmen der somatischen Gentherapie eingesetzt werden sollen.

Fig. 5 zeigt zwei bevorzugte Ausführungsformen der Erfahrung. Der eine Vektor enthält eine komplette Transkriptionseinheit bestehend aus Promotor (pgk = Phosphoglyceratkinase-Promotor), Protein-kodierender Sequenz (tkneo; HSV-Thymidinkinase-Neo-

mycintransferase Fusionsgen) und Polyadenylierungssignal (R-Region) in der U3 Region. Der Vektor enthält außerdem eine spezifische Targetsequenz -loxP- zwischen pgk und tkneo. Der zweite Vektor enthält darüber hinaus eine weitere, Rekombinase-exprimierende Transkriptionseinheit (MCCre; MC = HSV. Thymidinkinase Promotor mit Polyoma large T Enhancer) zwischen den LTRs.

Zusammen mit der U3 Region wird pgk-lx-tkneo dupliziert, so daß das provirale Genom zusammen mit MCCre zwischen zwei loxP Sequenzen gelangt. Diese Sequenzen werden bei Expression von Cre eliminiert. Im Genom verbleibt hauptsächlich eine pgk-lx-tkneo Transkriptionseinheit (Fig. 5).

Im dargestellten Beispiel befindet sich die Targetsequenz innerhalb der Transkriptionseinheit in der U3 Region. Diese Konstellation ist nicht zwangsläufig. Die Targetsequenz kann auch außerhalb der Transkriptionseinheit in der U3 oder U5 Region liegen. Gleichfalls kann die Transkriptionseinheit in der U5 Region liegen. Schließlich muß die Rekombinase nicht zwangsläufig vom gleichen Provirusemolekül synthetisiert werden und kann in Form von Protein oder exprimierender DNA separat hinzugefügt werden.

Beispiel I

Zum Nachweis der Deletierbarkeit von Targetsequenz-flankierten Provirusequenzen wurde eine Transkriptionseinheit pgk-loxP-tkneo in die U3 Region eines enhancerlosen Moloney Murine Leukemia Virus kloniert (Fig. 4).

Plasmide und Klonierung

Aufbau der pgk-lox-tkneo-Kassette:
Ein loxP-Sequenz enthaltendes EcoRI-PstI Fragment von pGEM30 (8) wurde in pBluescript II KS+ (Strategene) subkloniert (pBSlox). In die BamHI-XbaI-Schnittstellen des resultierenden Plasmids wurde anschließend der pgk-Promotor als BglII-XbaI-Fragment aus pPGK/Cat (19) eingefügt (pBSpklox). Die für das HSV-Tk/Neomycin-Phosphotransferase-Fusionsgen kodierende Sequenz wurde als NheI-Fragment aus pggU3tkneo ((18), Friedel & von Melchner, nicht veröffentlicht) ausgeschnitten und nach Füllen der Überhänge als blunt-end-Fragment in die EcoRV Schnittstelle von pBSpklox eingesetzt. Die so aufgebaute pgk-lox-tkneo-Kassette kann als XbaI-Fragment aus pBSpkloxtkneo ausgeschnitten werden.

Konstruktion der MCCre-Kassette:
Der MC-Promotor und die kodierenden Sequenzen für Cre wurden mittels eines partiellen Verdaus durch MluI aus pMCCre (8) ausgeschnitten und nach Auffüllen der Überhänge als blunt-end Fragment in die EcoRV-Schnittstelle von pBluescript II KS+ subkloniert (pBSMCCre). Aus diesem Plasmid kann die MC-Cre Kassette ohne Polyadenylierungssignal als XbaI-Fragment ausgeschnitten werden.

Konstruktion der retroviralen Vektoren:
Die proviralen Sequenzen von pBabe/puro (10) wurden durch diejenigen des SacI-Fragments von pggU3en(-) (20) ersetzt. Es resultiert ein Plasmid mit proviralen Sequenzen, in denen der Enhancer des 3'-LTR deletiert ist und das einzelne Klonierungsschnittstellen nach gag (BamHI, XbaI) und im 3'-LTR (NheI) aufweist (pBU3). In die NheI-Schnittstelle wurde nach Auffüllen der Überhänge die pgk-lox-tkneo-Kassette (XbaI-Frag-

ment aus pBSpgkloxTkneo) inseriert = pU3lxtkneo. Anschließend wurde die MCCre-Transkriptionseinheit als Xhol-Fragment aus pBSMCCre in die Xhol-Schnittstelle des resultierenden Plasmids eingesetzt = pU3lxtkneoMCCre.

Viren und Zellen

BOCS23 (15) und NIH3T3 Zellen wurden in DMEM (Gibco) mit 10% FCS gezüchtet. 20 µg der Plasmide pU3pgkloxTkneo oder pU3pgkloxTkneoMCCre wurden in jeweils 4×10^5 BOCS23 Zellen wie früher beschrieben transfiziert (19). Zellfreie Überstände wurden nach 48 stündiger Inkubation gewonnen und zur Infektion von 1×10^5 NIH3T3 Zellen benutzt. Provirus exprimierende Klone wurden nach 10-tägiger Selektion in 400 µg/ml G418 (Gibco) isoliert. In einem weiteren Ansatz wurden 20 µg pMCCre zusammen mit 1 µg pBABE/Puro in zwei U3pgkloxTkneo exprimierende NIH3T3-Klone transfiziert. Puromycin-resistente Zellpopulationen wurden nach 10-tägiger Selektion in 2 µg/ml Puromycin isoliert.

Southern blot Hybridisierung

Genomische DNA aus Retrovirusvektor-infizierten und MCCre transfizierten Klonen wurde mit den Enzymen Xba1/Nde1 oder Hind III geschnitten. Nach Fraktionierung auf 1% (w/v) Agarosegelen wurde die DNA auf Hybond-Plus (Amersham) Membranen transferiert und mit 32 P-markierten Neo-Sonden wie früher beschrieben hybridisiert (20).

Ergebnisse

Die Expressionskassette pgkloxTkneo wurde in die Nhe 1 Schnittstelle der U3 Region eines enhancerlosen Moloney murine leukemia virus Vektor kloniert (Fig. 5). Der entstandene Retrovirus-Vektor – pU3pgkloxTkneo – wurde transient in der Helferzelle – BOCS23 – verpackt. NIH3T3 Zellen wurden mit hochtitrigen, helfervirusfreien BOCS23 Überständen infiziert. Provirus-exprimierende Klone wurden in G418 isoliert und mit den Expressionsplasmiden pMCCre und pBABE/Puro transfiziert. DNA aus Puromycin-resistenten und aus entsprechenden nicht-transfizierten Ursprungsklonen wurde auf Southern Blots analysiert. Fig. 6 zeigt, daß als Folge einer Cre vermittelten Deletion loxP flankierter Sequenzen, die Provirus-enthaltenen NdeI/XbaI Restriktionsfragmente insgesamt kleiner werden. Entsprechend sind die loxP flankierten proviralen Sequenzen auf Hind III Restriktionsfragmenten nur noch bedingt nachweisbar (Fig. 6).

Die Ergebnisse besagen, daß (i) die Extrasequenzen in der U3-Region einschließlich loxP die Virusreplikation nicht behindern; (ii) die duplizierten loxP Sequenzen von Cre Rekombinase erkannt und rekombiniert werden und dabei, (iii) die zwischen loxP Elementen liegenden viralen und nicht-viralen Sequenzen deletiert werden.

Beispiel II

Zur Beantwortung der Frage ob die Cre/loxP vermittelte Rekombination auch dann funktioniert, wenn sich Cre kodierende und loxP Sequenzen auf dem gleichen Molekül befinden, wurde die MCCre Kassette zwischen die beiden LTRs des U3pgkloxTkneo Vektors kloniert

(Fig. 7). Das erhaltene Plasmid – pU3pgkloxTkneoMCCre – wurde zur Retrovirusproduktion in BOCS23 Zellen, wie in Beispiel 1 beschrieben, transfiziert. U3pgkloxTkneoMCCre exprimierende NIH3T3 Zellen wurden nach Infektion als Klone in G418 isoliert, und deren Integrationen auf Southern Blots analysiert: Die Untersuchung der U3pgkloxTkneo und U3pgkloxTkneoMCCre Integrationen in mehreren unabhängigen Klonen ergab, daß bei vergleichbarer Anzahl von Proviren die Intensität der konstanten (und im Falle einer Rekombination verschwindenden) Hind III Fragmente in MCCre exprimierenden Klonen 5–10-fach reduziert wird (Fig. 7). Dies bedeutet, daß aus einer signifikanten Fraktion der U3pgkloxTkneoMCCre Proviren die loxP flankierten Sequenzen einschließlich MCCre deletiert wurden.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Schematische Darstellung eines konventionellen Retrovirus und dessen integrierte Form (Provirus).

Fig. 2: Funktionelle Darstellung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems.

Fig. 3 und 4: Schematische Darstellung der Retroviren der Erfindung und der nach Integration stattfindenden Rekombination. P = Promotor; Ts = Targetsequenz; PKS = Protein-kodierende Sequenz; Rec = Rekombinase.

Fig. 5: Struktur der retroviraalen Vektoren U3pgkloxTkneo und U3pgkloxTkneoMCCre.

Fig. 6: Southern Blots von U3pgkloxTkneo exprimierenden Klonen vor und nach MCCre Transfektion. Die DNA der ersten 6 Bahnen wurde mit den nicht im Provirus schneidenden Enzymen Nde I und Xba I verdaut. Die restlichen DNAs wurden mit dem in den LTRs schneidenden Enzym Hinf III verdaut. – = ohne Cre; + = mit Cre.

Fig. 7: Southern Blots von U3pgkloxTkneo und U3pgkloxTkneoMCCre exprimierenden Klonen. Die Intensitätsabnahme der konstanten Hind III Fragmente in U3pgkloxTkneoMCCre Klonen wird beim Vergleich der 4.7 kb (A = U3pgkloxTkneo) und 6 kb (B = U3pgkloxTkneoMCCre) Banden erkennbar. Die variablen Banden entsprechen der Anzahl der Integrationen.

Literatur

- Akgün, E., M. Ziegler, and M. Grez. 1991. Determinant of retrovirus gene expression in embryonal carcinoma cells. *J Virol.* 65 : 382–388.
- Amariglio, N., and G. Rechavi. 1993. Insertional mutagenesis by transposable elements in the mammalian genome. *Environ. Mol. Mutagen.* 21 : 212–218.
- Broach, J. R., and J. B. Hicks. 1980. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2m circle. *Cell.* 2 : 501–508.
- Challita, P. M., and D. B. Kohn. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 2267–2571.
- Cohen, M., and E. Larsson. 1988. Human endogenous retroviruses. *BioEssays.* 9 : 191–196.
- Golic, K. G., and S. Lindquist. 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell.* 59 : 499–509.

7. Grez, M., E. Akgün, F. Hiberg, and W. Ostertag. 1990. Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 : 9202—9206.

8. Gu, H., Y. Zou, and K. Rajewsky. 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP -mediated gene targeting. *Cell.* 73 : 1155—1164.

9. McDonald, J. F. 1993. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 : 855—864.

10. Morgenstern, J. P., and H. Land. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nicl. Acids. Res.* 18 : 3587—3596.

11. Nienhuis, A. W., C. E. Walsh, and J. Liu. 1993. Viruses as therapeutic gene transfer vectors, p. 353—414. In N. S. Young (ed.), *Viruses and Bone Marrow*. Marcel Dekker, New York.

12. Nusse, R. 1986. The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. *Trends Genet.* 2 : 244—247.

13. Nusse, R. 1991. Insertional mutagenesis in mouse mammary tumorigenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 171 : 44—65.

14. O'Gorman, S., D. T. Fox, and G. M. Wahl. 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* 251 : 13511355.

15. Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 8392—8396.

16. Sauer, B., and N. Henderson. 1988. Site-specific recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 5166—5170.

17. Sternberg, N., and D. Hamilton. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150 : 467—486.

18. von Melchner, H., J. V. DeGregori, H. Rayburn, S. Reddy, C. Friedel, and H. E. Ruley. 1992. Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes & Dev.* 6 : 919—927.

19. von Melchner, H., S. Reddy, and H. E. Ruley. 1990. Isolation of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 : 3733—3737.

20. von Melchner, H., and H. E. Ruley. 1989. Identification of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *J Virol.* 63 : 3227—3233.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Patentansprüche

-Region befindet.

5 5. Retrovirale DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 4, weiterhin eine Transkriptionseinheit umfassend.

6. Retrovirale DNA nach Anspruch 5, bei der sich die Transkriptionseinheit in der U3- oder U5-Region befindet.

7. Retrovirale DNA nach Ansprüchen 1—6, weiterhin einen viralen Promotor umfassend.

8. Retrovirale DNA nach Ansprüchen 1—7, weiterhin einen viralen Enhancer umfassend.

9. Säugetierzelle, deren Genom mindestens eine Targetsequenz nach Anspruch 1 und mindestens eine Protein-kodierende Sequenz umfaßt, aber im wesentlichen kein provirales Genom enthält.

10. Säugetierzelle nach Anspruch 9, bei der die Targetsequenz loxP ist.

11. Säugetierzelle nach Anspruch 9, bei der die Targetsequenz frt ist.

12. Verfahren zur Transduktion von cDNA Sequenzen in das Genom von Säugetierzellen, umfassen die Schritte:

— Konstruktion der retroviroalen DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 8 nach an sich bekannten Verfahren,

— Transfektion in Verpackungszelllinien,

— Selektion virusproduzierender Klone

— Infektion der Säugetierzellen,

— Expression der Rekombinase,

— Rekombination zwischen zwei Targetsequenzen, wobei gleichzeitig eine Deletion von der Rekombinase-enthaltenden Transkriptionseinheit und im wesentlichen aller proviraler Sequenzen stattfindet.

13. Verfahren nach Anspruch 12 umfassen weiterhin die Schritte:

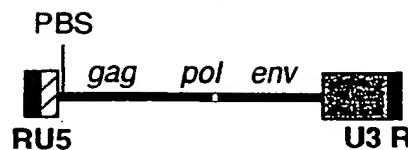
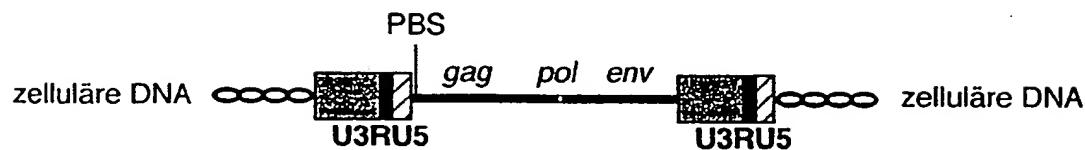
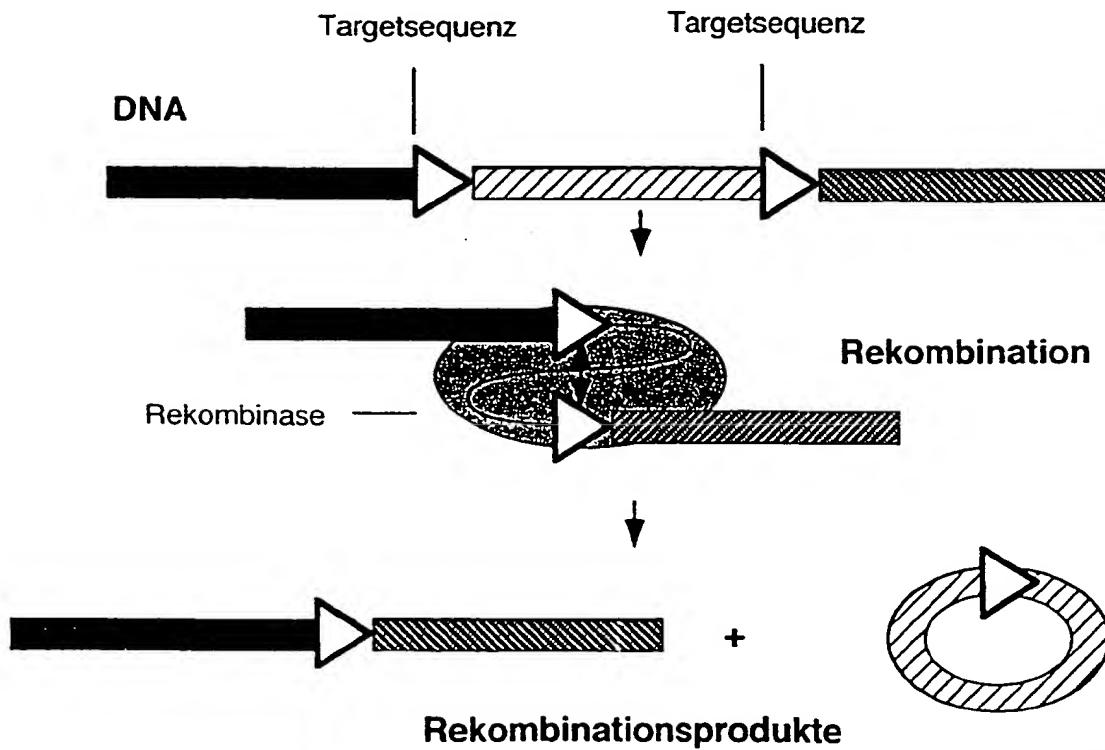
— Konstruktion der retroviroalen DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 8 nach an sich bekannten Verfahren,

— Infektion der Säugetierzellen,

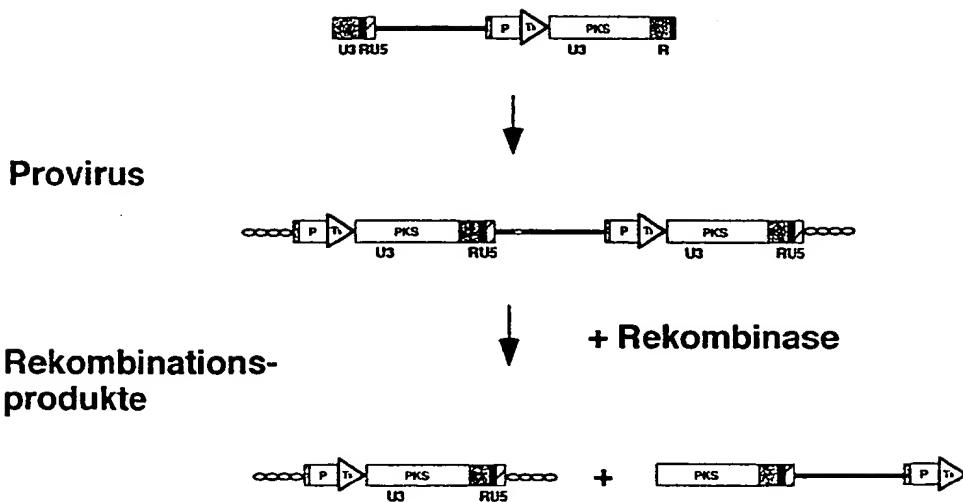
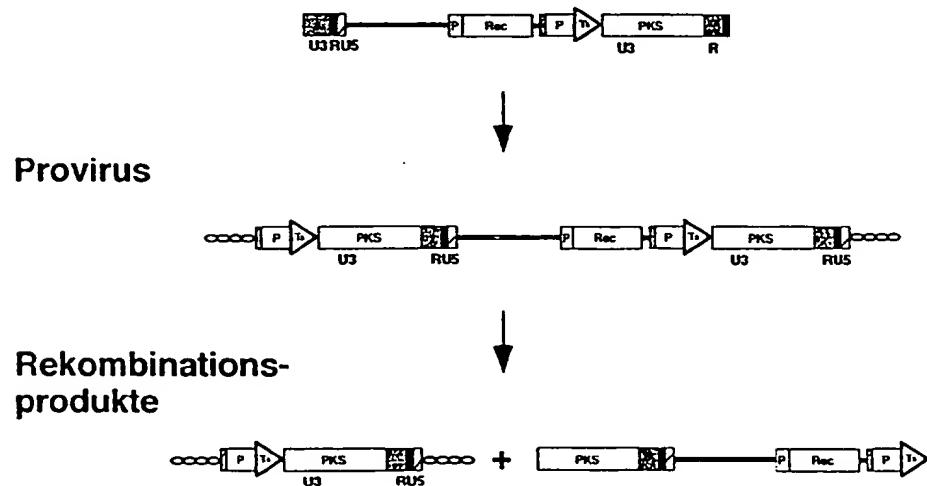
— Expression der Rekombinase,

— Rekombination zwischen zwei Targetsequenzen, wobei gleichzeitig eine Deletion von der Rekombinase-enthaltenden Transkriptionseinheit und im wesentlichen aller proviraler Sequenzen stattfindet.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

Figur 1**VIRUS (RNA)****PROVIRUS (DNA)****Figur 2**

602 068/270

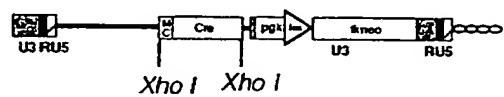
Figur 3**Retrovirus Vektor****Figur 4****Retrovirus Vektor**

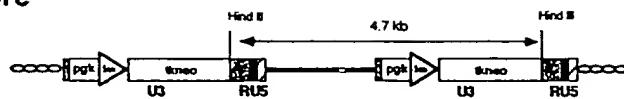
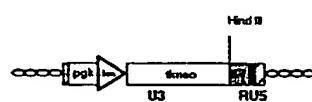
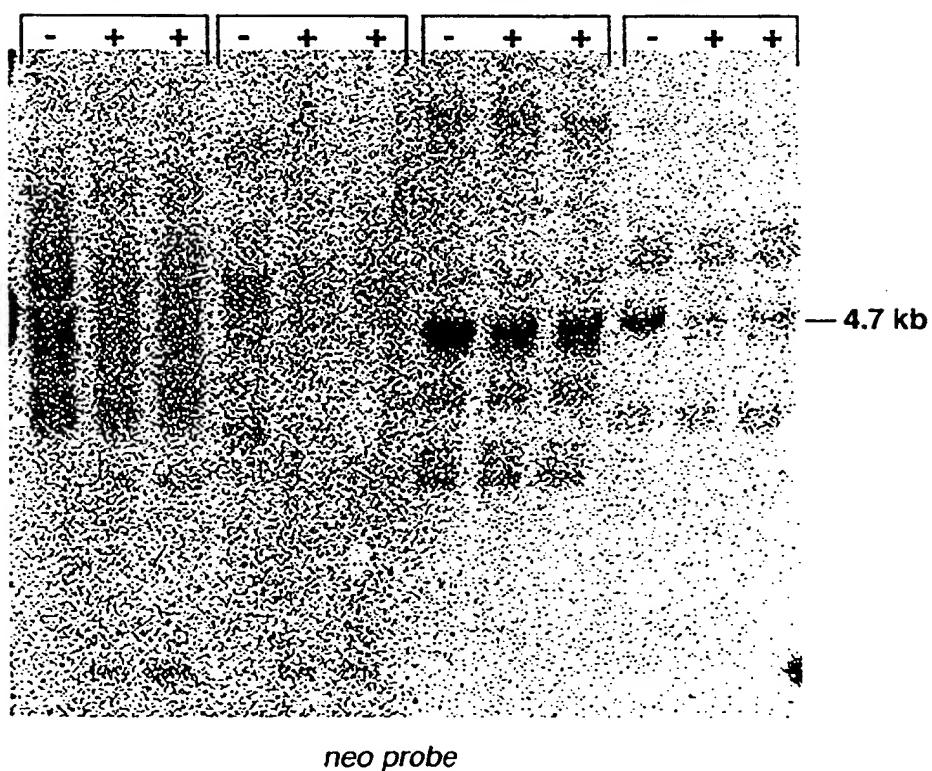
Figur 5

U3pgkIxtkneo



U3pgkIxtkneoMCCre



Figur 6**- Cre****+ Cre****Klon 6****Klon 11****Klon 6****Klon 11***neo probe*

Figur 7

